

氏 名	森 戸 慶 子
生 年 月 日	
本 籍	石川県
学 位 の 種 類	博士(薬学)
学 位 記 番 号	博乙第244号
学位授与の日付	平成14年3月22日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	イソフラボノイドのhER α 及び hER β を介したエストロゲン活性の解析
論文審査委員(主査)	正宗 行人(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	早川 和一(自然科学研究科・教授) 太田 富久(薬学部・教授) 木津 良一(自然科学研究科・助教授) 金城 順英(福岡大学・助教授)

学 位 論 文 要 旨

Estrogens play important hormonal roles in all vertebrates. Many plants produce compounds that possess estrogenic activity in animals and are, thus, called phytoestrogens.

Among the foods consumed by humans, soybeans contain the highest concentration of isoflavones. These soy isoflavones (e.g., daidzin, genistin and glycitin) may have some health-enhancing properties such as prevention of certain cancers, lowering the risk of cardiovascular diseases, and improvement of bone health. But phytoestrogens may also act as endocrine disruptors. For example, coumestrol is known to induce infertility in sheep, formononetin induce infertility in horse and cow.

Two estrogen receptors (ERs) have been identified to date and the physiological responses to estrogen are known to be mediated within specific tissues by at least these two receptors. I examined the estrogenic activities of the isoflavonoids by

(A) their binding to hER α and β , (B) their effect on estrogen receptor-dependent transcriptional expression.

(1) Most isoflavonoids bind more strongly to hER β than to hER α .

(2) The binding affinity of genistein is stronger than that of bisphenolA, which is known endocrine disruptors, but the transcription activity of genistein is comparable to that of bisphenol A. The results suggest that estrogenic activity is differ from genistein and bisphenol A.

エストロゲンは女性ホルモンとして女性生殖系の発達、機能調節において重要な働きを担っている。発生期、発達期においては、脳の性分化に関与し、思春期には、2次性徴や骨端の閉鎖に必要であり、成人期においては、性周期の維持や妊娠時の生殖臓器の機能調節にも働く。また、骨量減少を抑制し、血管平滑筋細胞の増殖を抑制するという生殖系以外の作用も持つ。こうしたエストロゲンの様々な生理的作用は、エストロゲン受容体（ER）を介して引き起こされる。ERは、核内レセプターの3Aメンバーとして分類されており、2つのサブタイプが存在する。1986年ヒトER（現在のhER α ）が発見され、1996年以降相次いで新規ER（ER β ）がラット、ヒト及びマウスから同定された。

生体内で様々な作用を持つエストロゲンは、我々ヒトをはじめとする動物にとって、とても重要であるが、植物中にもエストロゲン作用を示す物質が存在することが見いだされ、これらの物質を、一般に、植物エストロゲンという。植物エストロゲンの代表として、イソフラボノイドがあげられ、イソフラボンとクメスタンに分けられる。イソフラボンは、マメ科の大豆（特に胚軸）に多く含まれている。大豆摂取量の多いアジア系の人々に、乳ガンや前立腺ガン、循環器系疾患、骨粗鬆症などの発生率が低いのは、大豆に含まれるイソフラボンの働きではないかと考えられている。

しかし、その一方で、イソフラボノイドにエストロゲン作用があることから、内分泌攪乱物質である可能性も指摘されている。例えば、クメストロールは、地中海産のクローバーを大量に摂取した羊の多くに不妊をもたらした。また、フォルモノネチンを含むアカツメクサ摂取により牛や馬に同様の障害が起こり、明らかに内分泌攪乱が起こったと考えられる。どちらも、マメ科植物に含まれるイソフラボノイドである。私は、ゲニステインやダイゼインに有用性があり、クメストロールやフォルモノネチンに内分泌攪乱性があるとされる理由が、これらの化合物のもつエストロゲン活性の違いにあると考えた。

そこで、これらの化合物のエストロゲン活性を調べるために、それぞれの化合物のhERに対する結合性の違いを検討することにした。

内分泌攪乱物質や植物エストロゲンがエストロゲン活性を示すのは、それらの化合物が17 β -エストラジオールと同様にhERに結合するからと考えられる。hERを介したエストロゲン活性の強さは、hERとの結合の強さである。しかし、結合を示す化合物のすべてがエストロゲン作用を示すアゴニストではなく、活性を抑えるアンタゴニストもある。アゴニストかアンタゴニストかを調べるには、その化合物がhERに結合するかどうか、結合後に遺伝子発現するかどうかを検討すべきである。そこで以下の2つの方法を使って調べた。

（A）hER結合実験

各化合物に放射性同位元素で標識しhERとの結合を調べるのが最良の方法だが、それは非常に困難なので、[³H]-17 β -エストラジオールのhERに対する結合の試験化合物による競合的阻害を調べた。結合力の違いから各化合物のエストロゲン活性を推定した。

（B）hER導入酵母を用いた β -ガラクトシダーゼ誘導実験

エストロゲン活性をエストロゲンに応答する遺伝子の発現量で測定した。レポーター遺伝子として β -ガラクトシダーゼを用いた。この方法では、Aの結合試験でhER結合活性を示した試験化合物が遺伝子発現を起こさない場合、反応液に17 β -エストラジオールを添加することでアンタゴニスト活性を測定できる。

それぞれの実験には、完全長のhER α 及びhER β を用い、2つのサブタイプに対する

作用を比較し、これらのレセプターの働きについて推察した。

私は、3種類の大豆イソフラボン（ゲニスチン、ダイジン、グリシチン）とその腸内代謝産物と類似化合物、内分泌攪乱性のあるクメストロール及びフォルモノネチンなどのエストロゲン活性を調べた。その結果をもとにしてゲニステインとクメストロールの作用機構を比較し、有効性と内分泌攪乱性を検討した。また、これらの化合物のアンドロゲン活性、抗アンドロゲン活性についても検討した。

(1) コントロール化合物のエストロゲン活性（予備実験）

17 β -エストラジオール、合成エストロゲンでその活性が強いジエチルstilbestrol（DES）、内分泌攪乱性の指摘されているビスフェノールAとノニルフェノール、エストロゲンのアンタゴニストとして臨床で使用されているタモキシフェンについてのエストロゲン活性を測定した結果を図1に示す。

DESは、hER α に対しても、hER β に対しても、17 β -エストラジオールとほぼ同等に強く結合し（図1-A）、 β -ガラクトシダーゼの発現においても、強いエストロゲン作用を示した。

ビスフェノールA、ノニルフェノールについては、hERに対する親和性が比較的弱く、 β -ガラクトシダーゼの発現も微弱であることがわかった。また、ヒト乳ガン細胞MCF-7を用いた増殖実験で、高濃度のビスフェノールAやノニルフェノールに対しては、細胞の増殖が観察できた（図1-C）。

また、ビスフェノールA、ノニルフェノールのhER β への結合は、17 β -エストラジオールの1/1000、hER α への結合は、1/10000であった。このように、ビスフェノールA、ノニルフェノールはともに、hER α よりもhER β に10倍以上強く結合し、hER α とhER β に対する結合性に違いがあることが明らかになったが、遺伝子誘導活性ではあまり違いが認められなかった。

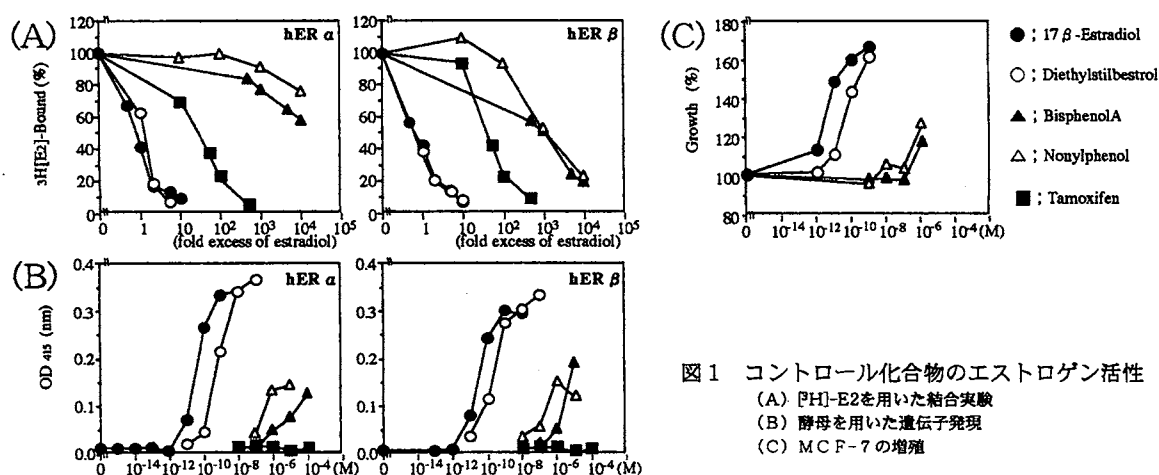


図1 コントロール化合物のエストロゲン活性
(A) [3H]-E2を用いた結合実験
(B) 酵母を用いた遺伝子発現
(C) MCF-7の増殖

(2) 大豆イソフラボンとその腸内代謝物のエストロゲン活性

配糖体であるダイジン、グリシチン、ゲニスチンは、いずれも、hER α に対する結合はなく、hER β に対する結合も非常に弱かった。腸内細菌により非配糖体となったダイゼイン、グリシテイン、ゲニステインの結果は、図2、さらなる代謝を受けたイコール、

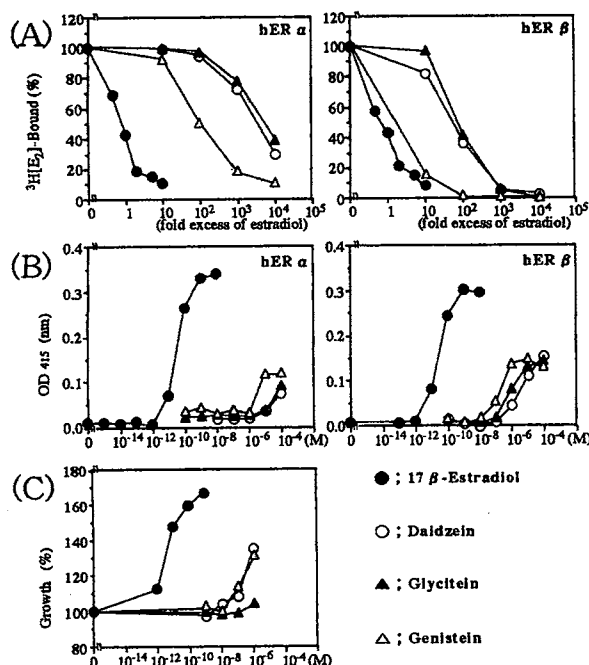


図2 ダイゼイン、グリシテイン、ゲニステインのエストロゲン活性

- (A) $[^3\text{H}]$ -E2を用いた結合実験
(B) 酵母を用いた遺伝子発現
(C) MCF-7の増殖

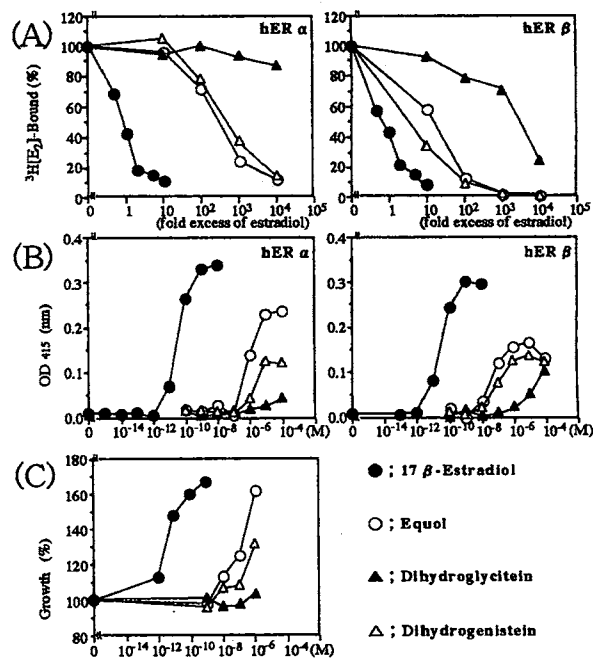


図3 イコール、ジヒドログリシテイン、ジヒドロゲニステインのエストロゲン活性

- (A) $[^3\text{H}]$ -E2を用いた結合実験
(B) 酵母を用いた遺伝子発現
(C) MCF-7の増殖

ジヒドログリシテイン、ジヒドロゲニステインの結果は、図3に示す。

ダイゼイン、イコール、ゲニステイン、ジヒドロゲニステインのそれぞれの実験におけるエストロゲン活性を比較すると次のようになった。

hER α 及びhER β への結合力は、ゲニステイン>イコール \approx ジヒドロゲニステイン>ダイゼインとなり、特に、ゲニステインのhER β に対する結合は、非常に強く、17 β -エストラジオールと同程度であった。

Bの実験では、イコールの活性が高かった。イコールの約10倍強いhER β 結合力を示すゲニステインが、イコールの約1/10の β -ガラクトシダーゼの誘導しか示さなかった。4つの化合物の β -ガラクトシダーゼの誘導活性を比較すると、イコール>ゲニステイン \approx ジヒドロゲニステイン>ダイゼインとなり、AとBの実験で、ゲニステインとイコールの逆転が起こった。これは、17 β -エストラジオールとほぼ同程度のhER結合力を示すゲニステインの β -ガラクトシダーゼの誘導活性が弱い(17 β -エストラジオールの約1/1000)ためである。

(3) その他のイソフラボノイドと大豆サポニン及び関連化合物のエストロゲン活性

(A) hER結合実験、(B) hER導入酵母を用いた β -ガラクトシダーゼ誘導実験の2つの方法で、種々イソフラボノイドと大豆サポニン及び関連化合物のエストロゲン活性を調べた。

ゲニステインの3つの水酸基(4'-OH、5-OH、7-OH)のいずれかがメチル化すると、エストロゲン活性は弱くなることがわかった(図4)。また、6位に官能基が付加されると、エストロゲン活性が弱くなった。

クメステロールは強いエストロゲン活性、フォルモノネチンは、非常に弱いエストロゲ

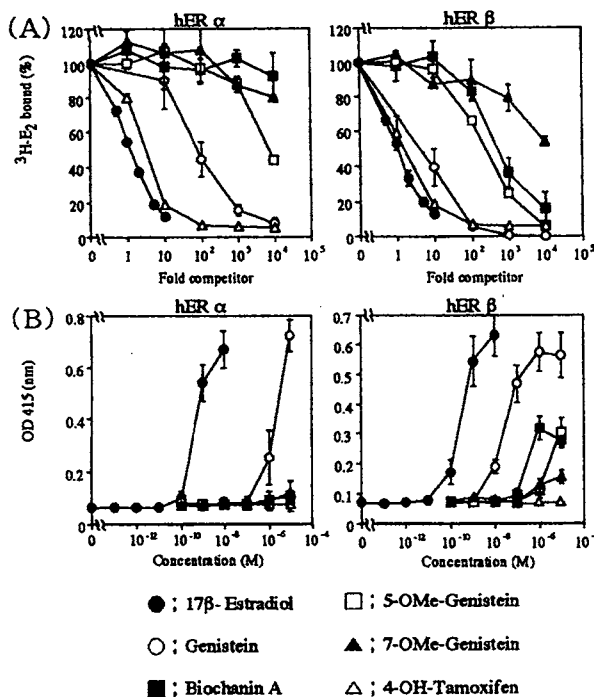


図4 バイオカニンA、5-OMe-ゲニステイン、7-OMe-ゲニステインのエストロゲン活性

(A) $^3\text{H-E}_2$ を用いた結合実験
(B) 酵母を用いた遺伝子発現

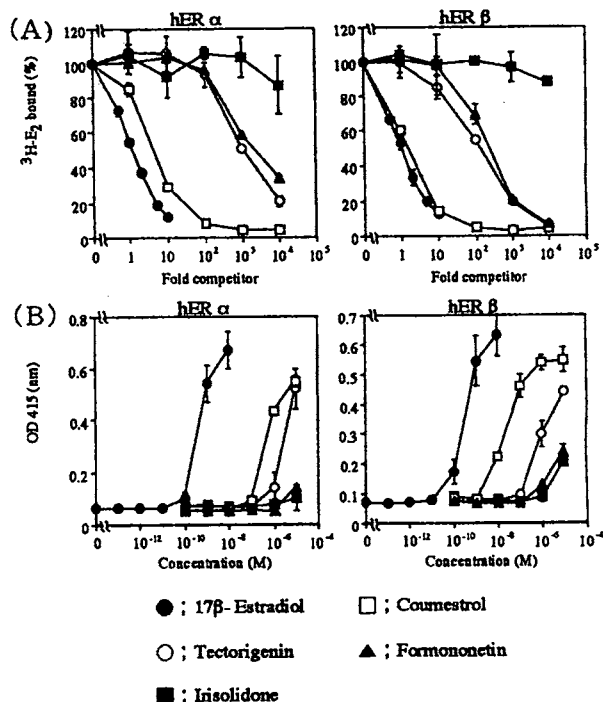


図5 テクトリゲニン、イリソリドン、クメストロール、フォルモノネチンのエストロゲン活性

(A) $^3\text{H-E}_2$ を用いた結合実験
(B) 酵母を用いた遺伝子発現

ン活性を示した(図5)。さらに、酵母を用いたアンタゴニスト作用の実験から、フォルモノネチンにアンタゴニスト作用があることがわかった。

また、大豆サポニン及び関連化合物は、hERに結合し、アンタゴニスト作用を持つことがわかった。以上の結果をまとめ、比較したものを図6に示す。

(4) イソフラボノイドと大豆サポニン及び関連化合物のアンドロゲン作用

3種類の大豆イソフラボン(ゲニスチン、ダイジン、グリシテイン)とその腸内代謝産物と類似化合物、内分泌攪乱性のあるクメストロール及びフォルモノネチンのすべてに、アンドロゲン活性はなかった。

(5) イソフラボノイドの抗アンドロゲン作用

バイオカニンA、イリソリドンは、エストロゲン作用と、抗アンドロゲン作用をあわせもつ化合物であることがわかった。殺虫剤に含まれるDDTは、hARに結合し、テストステロン誘導性の細胞反応を阻害することが分かっているが、その一方で、hERに結合性を示すことも分かっている。バイオカニンA、イリソリドンは、DDTと同様に、hER、hARの2つのレセプターを介して内分泌攪乱を起こす可能性が示唆された。

内分泌攪乱物質

イソフラボノイドなど植物成分

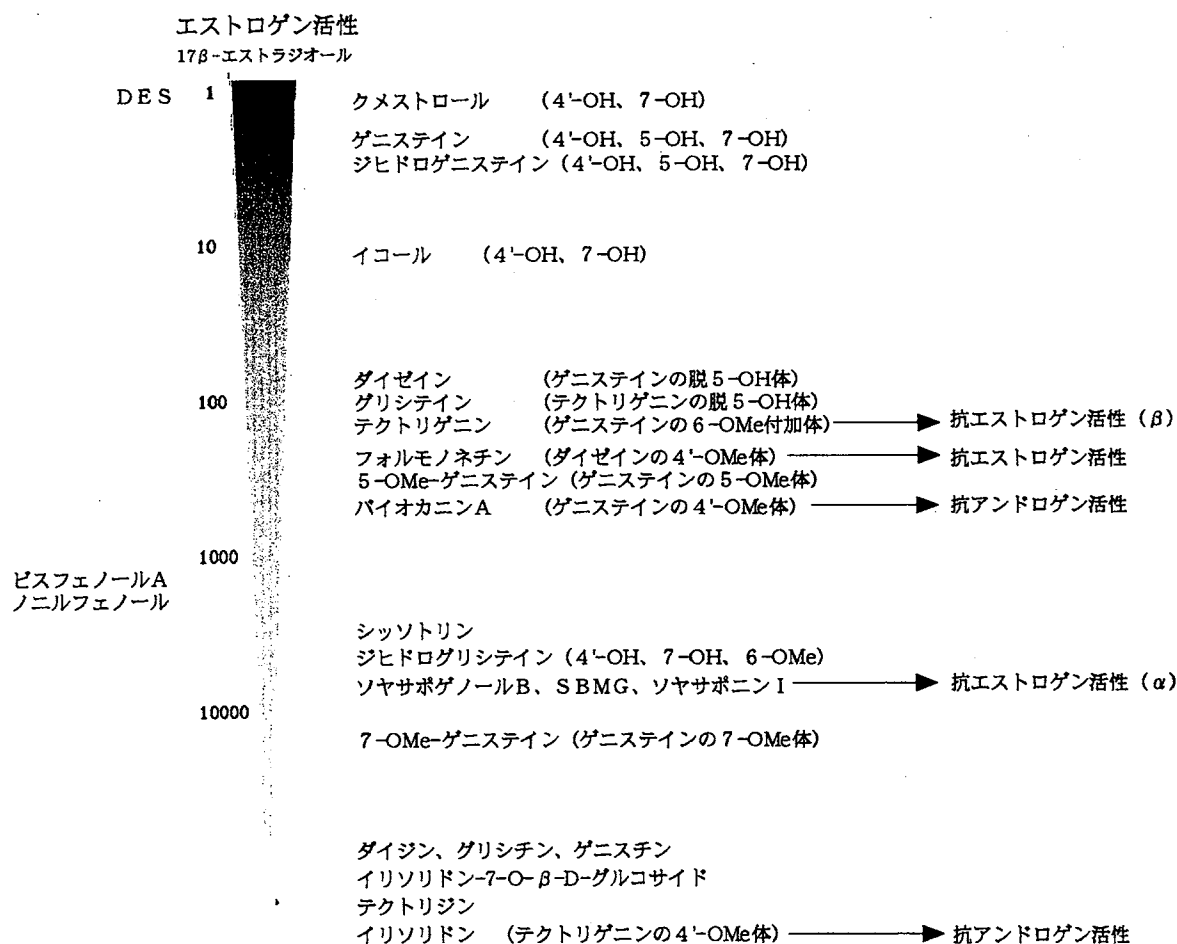


図6 イソフラボノイド等のエストロゲン活性
(hERβに対する結合活性の比較)

以上、種々イソフラボノイドのhERα及びhERβを介したエストロゲン活性を検討した結果、次のことが明らかとなった。

(1) イソフラボノイドの構造とエストロゲン活性

イソフラボノイドのhERへの結合には、4'-OH、5-OH、7-OHの3つの水酸基が重要な役割を担っており、6位の官能基の存在はエストロゲン活性を弱める。

(2) hERα及びhERβに対する結合活性とhERα及びhERβに依存する遺伝子誘導活性

エストロゲン活性を示す化合物のほとんどが、hERαよりもhERβに対して強く結合し、hERβを介した遺伝子誘導の方が強かった。この結合活性、誘導活性の違いは、hERα、hERβのリガンド結合領域の構造の差を反映していると考えられる。つまり、hERβのリガンドに対する構造認識の甘さが推察される。

(3) ゲニステインの内分泌攪乱性

ゲニステインとビスフェノールAのhERα、hERβとの結合力や遺伝子誘導力を比較すると、遺伝子誘導力に違いはないが、ゲニステインは、ビスフェノールAよりはるかに強くhERα、hERβに結合する。このことから、ゲニステインはアンタゴニスト的

にも働き、自身よりhERへの結合力の弱い化合物（例えばビスフェノールA）の結合を阻害しうる。また、エストロゲンの活性も弱める可能性もあるが自身にアゴニスト活性があるので完全に阻害することもない。このような微妙な作用のバランスで内分泌攪乱物質と言うよりはむしろ有用成分として働くと思われる。

（4）クメストロール、フォルモノネチンの内分泌攪乱性

クローバーを摂取した羊の多くに不妊をもたらしたクメストロールのhER α とhER β への結合は17 β -エストラジオールと同じで、遺伝子誘導活性も高かった。しかし、牛や馬に同様の障害を起こしたフォルモノネチンのエストロゲン活性は、非常に弱く、むしろアンタゴニスト活性をもっていた。クメストロールの強いエストロゲン活性が、体内エストロゲンの正常な周期的変動を乱し、排卵、着床といった妊娠初期に影響を及ぼし不妊をもたらしたと考えられるが、フォルモノネチンについては、そのエストロゲン活性は弱く、これが不妊の原因とは考えにくく、クメストロールとは別の機構で内分泌攪乱することが示唆された。

学位論文審査結果の要旨

本論文は申請者が金沢大学薬学部微生物薬品化学研究室で行ったイソフラボノイドのエストロゲン活性の研究をまとめたものである。イソフラボノイドは植物エストロゲンを代表する化合物である。申請者はイソフラボノイドのエストロゲン活性を完全長ヒトエストロゲンレセプター（hER）を使い、以下の二通りの方法で調べた。1) 昆虫細胞で増やしたレセプターとの結合。2) 遺伝子組み換え酵母を使った遺伝子発現。なお、hERには α と β の2種類があるのでそれぞれについて調べた。

大豆に含まれるイソフラボノイド配糖体とそれらが腸内細菌により消化されて出来るイソフラボノイドを調べた。その結果、ゲニステイン、イコール及びジヒドロゲニステインが強くレセプターに結合したが、遺伝子誘導はそれほど強くなかった。hER β にhER α よりいずれの化合物も強く結合した。また、イソフラボノイドのメチル化誘導体についても調べた。その結果、イソフラボノイドの7-OHと4'-OHがレセプターとの結合に重要なことが分かった。これらの水酸基はエストラジオールの17-OHと3-OHに対応すると考えられる。レセプターへの結合と遺伝子誘導が平行しないことについても検討した。

この論文はイソフラボノイドのエストロゲン活性と構造との関係を調べたものである。完全長のhER α と β を使いイソフラボノイドのエストロゲン活性を、これへの結合と遺伝子誘導の二通りの方法で調べた研究であるが、このような研究はこれまでになく、また大豆イソフラボノイド配糖体の代謝産物を系統的に調べた研究も初めてである。研究内容もまとまっており博士論文に値すると判定する。